

PCT/NL

10/511700

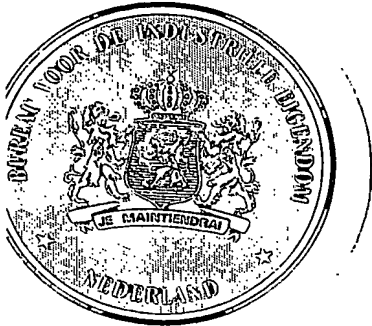
03/00293

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



REC'D 22 MAY 2003

WIPD

PCT

BEST AVAILABLE COPY

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 18 april 2002 onder nummer 1020426,
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK TNO**
te Delft, Nederland

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Modificatie van de eigenschappen van een fibrinematrix met betrekking tot groei en ingroei van
cellen",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 08 mei 2003

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

Mw. M.M. Enhus

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1020426

B. v.d. I.E.

18 APR. 1977

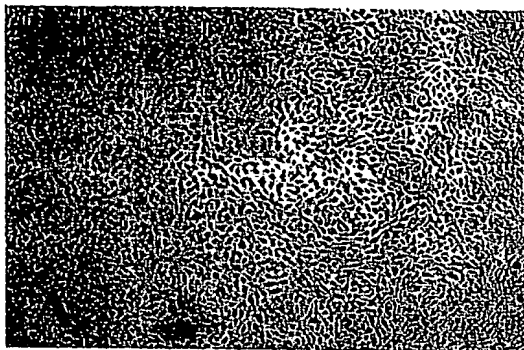
Uittreksel

Titel: Modificatie van de eigenschappen van een fibrine-matrix met betrekking tot groei en ingroei van cellen

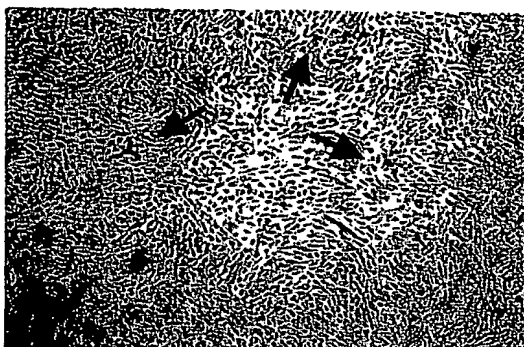
Werkwijze voor het modificeren van de eigenschappen van een fibrinematrix met betrekking tot groei en ingroei van cellen, waarbij voor de vorming van de fibrinematrix een fibrinogeen wordt gebruikt dat bestaat uit een gekozen fibrinogeenvariant of een fibrinogeen dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is. Met name leidt het gebruik van hoogmoleculairgewicht (HMW) fibrinogeen tot een fibrine met versnelde angiogenese eigenschappen, terwijl gebruik van laagmoleculairgewicht (LMW en/of LMW') fibrinogeen tot fibrine met vertraagde angiogenese eigenschappen leidt. Gebruik van HMW fibrinogeen bij het opzetten van angiogenese tests heeft tot gevolg dat de tests minder tijd vergen. Fibrine sealants op basis van HMW fibrinogeen kunnen worden gebruikt bij brandwonden, om wondheling te bevorderen of om littekenweefsel tegen te gaan. Fibrine sealants op basis van LMW of LMW' fibrinogeen zijn bruikbaar om verklevingen en tumorgroei tegen te gaan, bijv. na chirurgische ingrepen.

Dag 3

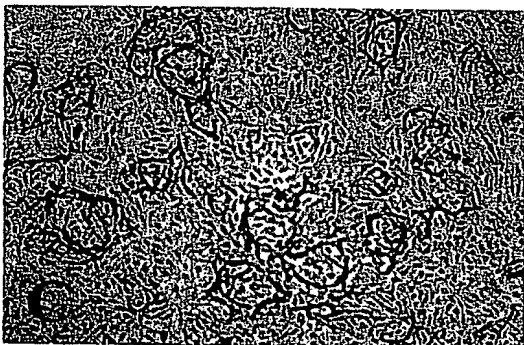
Ongefractioneerd, niet gestimuleerd



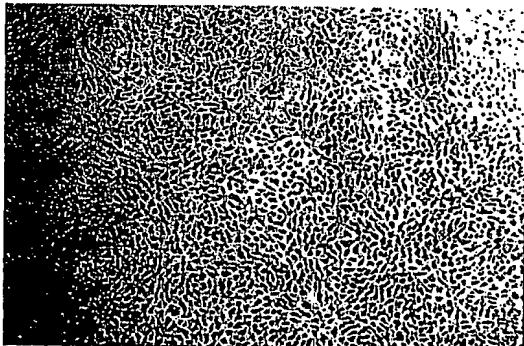
Ongefractioneerd, bFGF + TNF α



HMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α

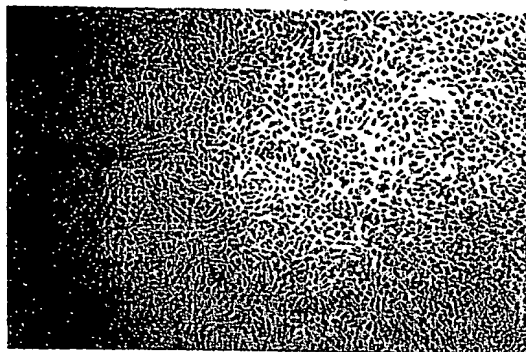


LMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α

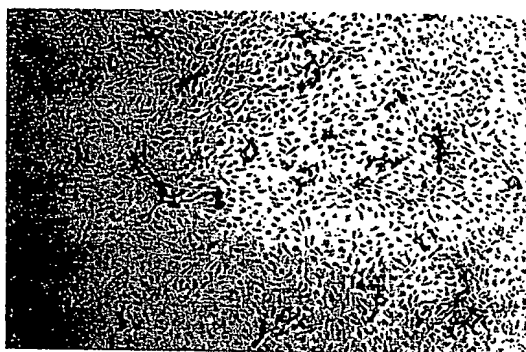


Dag 7

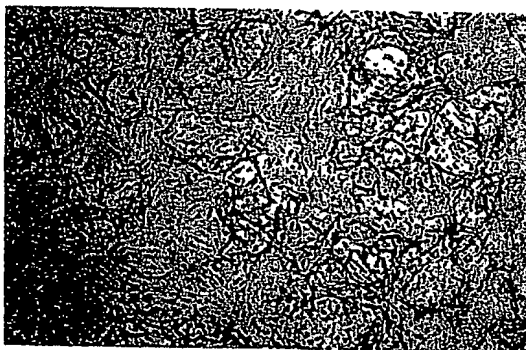
Ongefractioneerd, niet gestimuleerd



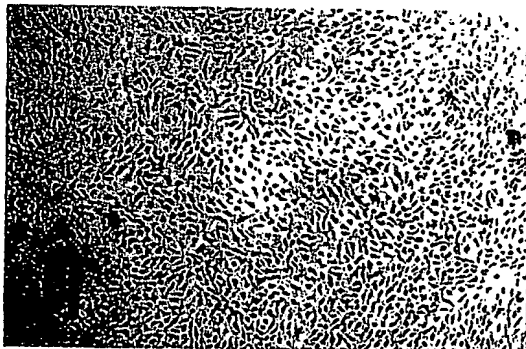
Ongefractioneerd, bFGF + TNF α



HMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α



LMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α



P58796NL00

Titel: Modificatie van de eigenschappen van een fibrine-matrix met betrekking tot groei en ingroei van cellen

Achtergrond

Fibrinogeen

Fibrinogeen is een oplosbaar plasma-eiwit dat een belangrijke rol speelt in de bloedstolling. Het fibrinogeen-molecuul, met een molecuulgewicht van ongeveer 340 kDa, circuleert in plasma in een concentratie van 2-4 g/l. Het heeft een langwerpige structuur en is 475 Å lang en 8-15 Å in diameter, met een tweevoudige symmetrie-as door het centrum van het molecuul. Het molecuul bestaat uit twee sets van drie polypeptideketens, de A α , B β en γ ketens, die onderling door disulfidebruggen worden verbonden. Elk molecuul bevat aan de uiteinden twee D-domeinen, die middels coiled-coil segmenten verbonden zijn met het centrale E-domein. De A α -keten bevat 610, de B β -keten 461 en de γ -keten 411 aminozuren.

Het oplosbare fibrinogeen wordt aan het einde van de stollingscascade door trombine in onoplosbaar fibrine omgezet, waarna een netwerk van fibrinedraden wordt gevormd, dat de basis vormt van een bloedstolsel. Eerst worden door trombine twee polypeptides afgesplitst van de N-terminus van het fibrinogeenmolecuul, vervolgens worden protofibrillen gevormd door snelle non-covalente binding van de fibrine-monomeren. Deze protofibrillen worden gevormd uit een keten van om en om geplaatste moleculen en door laterale binding wordt een fibrinenetwerk gevormd. Ten slotte wordt het netwerk door factor XIIIa-gestimuleerde crosslinking gestabiliseerd.

Heterogeniteit

Er is een groot aantal patiënten met dysfibrinogenemie bekend, waarbij functionele delen van het fibrinogeenmolecuul zijn verdwenen of zodanig veranderd dat ze een andere functie hebben gekregen. Deze veranderingen leiden tot een breed scala aan variaties in fibrinogeen-functie en -structuur, en patiënten met een dysfibrinogenemie vertonen ook een variabel klinisch beeld, met zowel bloedings- als stollingsneiging. De oorzaak van dysfibrinogenemie zijn mutaties in het gen voor fibrinogeen en daarom is ook 50% (bij een heterozygoot) of 100% van het fibrinogeen (bij een homozygoot) afwijkend.

Naast deze ernstige en zeldzame variaties in het fibrinogeenmolecuul, bestaat er ook een mildere genetische vorm van variatie in het fibrinogeen. Bij een groot deel van de bevolking komen genetische polymorfismen voor, die echter slechts een mild of geen effect op fibrinogeenfunctie hebben. Als voorbeelden kunnen worden genoemd het T/A312 polymorfisme in het fibrinogeen alfa gen en het R/K448 polymorfisme in het fibrinogeen beta gen.

Daarnaast komt het fibrinogeen ook binnen elk individu in een groot aantal varianten voor, geschat wordt dat er in elk individu ongeveer 10^6 verschillende fibrinogeenmoleculen circuleren. Ook deze varianten geven slechts milde verschillen in fibrinogeen-functie en -structuur en zij maken steeds maar een klein gedeelte van het totale fibrinogeen uit (meestal niet meer dan enkele procenten). Zo bestaan er bijv. vormen met verschillende glycosyleringen en fosforyleringen en ook kan het C-terminale uiteinde van de alpha-keten van fibrinogeen *in vivo* gedeeltelijk worden afgebroken (zie Tabel voor een aantal voorbeelden van fibrinogeenvarianten). Deze verschillende vormen van fibrinogeen hebben elk hun typische karakteristieken waarbij de basisfunctie, het vormen van een fibrinenetwerk, intact blijft, maar de gevormde fibrine-netwerken in karakteristieken kunnen verschillen. Als gevolg

van de heterogeniteit is er variatie in o.a. de bindings-eigenschappen, bijvoorbeeld 1) van enzymen en eiwitten die een rol spelen bij fibrinolyse, of 2) binding van factor XIII, hetgeen de stabiliteit van het fibrine beïnvloedt, of
 5 3) variatie in snelheid en mate van laterale groei van het fibrine, resulterend in fibrine met bv. dunnere vezels, meer vertakkingen e.d.

Een van de bekende varianten is γ' (gamma') dat ontstaat door alternatieve processing van het primaire mRNA
 10 transcript. Ongeveer 8% van de totale γ -ketens is van deze vorm. De γ' ketens bestaat uit 427 aminozuren en de vier C-terminale aminozuren (AGDV) zijn daarin vervangen door een anionische sequentie van 20-aminozuren die 2 gesulfateerde tyrosines bevat. De fibrinogeen γ' keten bindt plasma factor
 15 XIII, maar bindt niet aan de plaatjes fibrinogeen receptor IIb β 3, dit in tegenstelling tot de normale γ keten waarvan de C-terminale sequentie (400-411) een kritische rol speelt bij het reguleren van bloedplaatjesaggregatie.

Een andere variant van fibrinogeen is Fib420, dat een
 20 molecuulgewicht van 420 kDa heeft. In gezonde personen maakt deze variant ongeveer 5% uit van het totale circulerende fibrinogeen. Door alternatieve splicing van het α -keten transcript wordt een extra open reading frame inbegrepen waardoor een A α -keten ontstaat die aan de carboxyterminale
 25 zijde met circa 35% verlengd is (847 aminozuren). Het extra stuk A α -keten heeft een nodulaire structuur en voorzover bekend komen geen fibrinogeenmoleculen voor die dit extra stuk maar aan één A α -keten hebben. Deze fibrinogeenvariant Fib420 zou minder gevoelig kunnen zijn voor afbraak en een
 30 effect op de stolsselstructuur kunnen hebben.

Een andere oorzaak van moleculaire heterogeniteit in de fibrinogeenmoleculen is een gedeeltelijke degradatie van het carboxyterminale deel van de A α -keten, wat resulteert in drie vormen van fibrinogeen met een verschillend molecuulgewicht.

Fibrinogeen wordt gesynthetiseerd in de hoogmoleculairgewicht vorm (HMW) met een molecuulgewicht van 340 kDa, met A α -ketens die 610 aminozuren bevatten. De degradatie van een van de A α -ketens geeft de laagmoleculairgewicht vorm (LMW) (MW=305 kDa) en daarna wordt ook de andere keten aangetast en ontstaat de LMW' vorm (270 kDa). In bloed van gezonde personen komt ongeveer 70% van het fibrinogeen voor in de HMW-vorm, 26% in de LMW vorm en 4% in de LMW' vorm. Het enzym dat voor de omzetting van HMW naar LMW en LMW' zorgt, is tot op heden nog niet geïdentificeerd, maar een aantal enzymen (bijvoorbeeld elastine en plasmine) is al uitgesloten. Het LMW fibrinogeen stolt iets langzamer dan HMW fibrinogeen en de LMW' vorm het langzaamst. Ook de ADP-geïnduceerde aggregatie van bloedplaatjes is minder bij LMW dan bij HMW fibrinogeen.

Angiogenese

Angiogenese, de uitgroei van nieuwe bloedvaatjes uit bestaande bloedvaten, is een essentieel proces gedurende de embryonale ontwikkeling, en komt bij volwassenen normaliter alleen voor bij het vrouwelijke voortplantingssysteem (bij de vorming van het corpus luteum en de placenta) en bij wondgenezing. Daarnaast is angiogenese ook geassocieerd met vele pathologische omstandigheden, zoals chronische ontstekingen, rheumatoïde artritis, tumoren en retinopathie bij diabetici. Het grootste verschil tussen deze twee vormen van angiogenese is dat bij "pathologische angiogenese" het proces gepaard gaat met vasculaire lekkage, de infiltratie van ontstekingscellen, zoals monocyten en lymfocyten, en de aanwezigheid van fibrine. De fibrine, die ontstaat na een verwonding van bloedvaten of door lekkage van fibrinogeen uit het plasma naar de weefsels, vormt een tijdelijke matrix die niet alleen functioneert als een barrière ter voorkoming van veel bloedverlies, maar ook een matrix is waarin nieuwe bloedvaten kunnen invaderen en groeien gedurende bijv. wondheling.

Het angiogenese proces wordt in gang gezet na activering van de endotheelcellen door angiogene groeifactoren en cytokinen. Deze produceren daarna proteolytische enzymen die nodig zijn voor de afbraak van de basaalmembraan onder de
5 endotheelcellen. Hierna volgt migratie van de endotheelcellen naar de onderliggende interstitiële weefsel/matrix, gevolgd door een proliferatie van de endotheelcellen. Aan het einde van het angiogenese proces moet, na de vorming van een lumen tussen de endotheelcellen, het nieuwe bloedvat gestabiliseerd
10 worden door de depositie van een nieuwe basaalmembraan en het aangaan van een nauwe interactie tussen endotheelcellen en pericyten.

De initiëring en de progressie van de angiogenese is nauw gecontroleerd door angiogene groeifactoren en cytokinen,
15 maar kan alleen plaatsvinden wanneer deze geschiedt in de juiste (tijdelijke) matrix. Indien dit niet het geval is, dan worden de endotheelcellen ongevoelig voor de stimulatie, of reageren op de stimulatie maar gaan daarna in apoptose. De interactie van de endotheelcellen met de fibrinematrix d.m.v.
20 cellulaire receptoren, zoals integrinen, bepaalt in grote mate de respons van de cellen op de stimulatie. Deze adhesiemoleculen zorgen niet alleen voor de aanhechting van de cellen aan de matrix, maar geven ook biochemische signalen door naar de cel. Door deze biochemische signalen krijgt de
25 cel informatie over de matrix-samenstelling en wordt de "responsiveness" van de cel t.o.v. bepaalde angiogene factoren en cytokinen beïnvloed.

Een gecontroleerde invasie van de tijdelijke matrix door de endotheelcellen is ook zeer belangrijk voor het proces van
30 angiogenese gedurende wondgenezing. Een te snelle ingroei kan leiden tot een te snelle afbraak van de matrix en daardoor een inadequate wondgenezing. Daarnaast zal een te langzame ingroei van bloedvaten kunnen leiden tot littekenweefsel. De ingroei van de endotheelcellen in de tijdelijke matrix wordt

daarom sterk gereguleerd door een aantal proteolytische
 enzymen met hun receptoren en een aantal remmers. Voorbeelden
 hiervan zijn de enzymen van het urokinase-type plasminogeen
 (u-PA)/plasmine systeem en de verschillende matrix metallo-
 5 proteasen (MMPs). Vooral het eerste systeem speelt bij de
 vorming van bloedvaten in de tijdelijke fibrinematrix een
 belangrijke rol.

Fibrinogeen in angiogenese

10 Het onderzoek naar determinanten van angiogenese heeft
 zich toegespitst op het optimaliseren van de toegevoegde
 (groei)factoren. De rol van normale variatie in het
 fibrinogeenmolecuul is er nog niet in betrokken. Wel is er
 aandacht geweest voor de effecten van fibrinogeen^{Nieuwegein}, een
 15 zeldzame mutatie in het fibrinogeen die ervoor zorgt dat
 albumine covalent aan het fibrinogeen wordt gebonden hetgeen
 sterische hindering bij het vormen van het fibrinestolsel
 geeft. Dit fibrinogeen vertoont ook een sterk verlengde
 stollingstijd en geeft zeer heldere stolsels (Collen et al,
 20 Blood 97: 973-980, 2001).

Korte samenvatting van de uitvinding

Wij hebben uitgebreid onderzoek gedaan naar de invloed
 25 die fibrinogeen uitoefent op de groei van cellen en vooral de
 vorming en ingroei van cellen en bloedvaatjes (angiogenese)
 in de uit het fibrinogeen gevormde fibrinematrix. In het
 bijzonder hebben wij daarbij onderzocht of er verschillen
 tussen normale natuurlijk voorkomende varianten van
 30 fibrinogeen optraden.

Verrassenderwijs vonden wij daarbij, dat verschillende
 varianten van fibrinogeen een verschillende invloed op
 celgroei en met name de vorming en ingroei van bloedvaatjes
 uitoefenen. Meer in het bijzonder stelden wij vast, dat LMW

fibrinogeen, vergeleken met totaal fibrinogeen dat in essentie een mengsel van HMW, LMW en LMW' fibrinogeen is, een verminderde cel- en vaatingroei geeft. Dit geldt tevens voor LMW' fibrinogeen. HMW fibrinogeen daarentegen is bevorderlijk voor celgroei en leidt tot een verhoogde cel- en vaatingroei, vergeleken met totaal fibrinogeen.

Van deze vinding kan op verscheidene manieren en voor verschillende doeleinden worden gebruik gemaakt, zoals in de hierna volgende gedetailleerde beschrijving van de uitvinding zal worden uiteengezet.

Korte Figuurbeschrijving

Figuur 1 bevat foto's A-H, die de resultaten tonen na 3 dagen (foto's A-D) resp. 7 dagen (foto's E-H) van proeven, waarbij humane microvasculaire endotheelcellen (hMVEC) werden uitgezaaid op een driedimensionale fibrinematrix, vervaardigd uit ongefractioneerd fibrinogeen (foto's A, B, E en F), HMW fibrinogeen (foto's C en G) of LMW fibrinogeen (foto's D en H) en niet gestimuleerd (foto's A en E) of gestimuleerd met een combinatie van bFGF en $\text{TNF}\alpha$ (foto's B-D en F-H). De foto's zijn representatief voor 3 verschillende experimenten.

Figuur 2 bevat foto's A-D, die de resultaten na 7 dagen tonen van proeven, waarbij humane microvasculaire endotheelcellen (hMVEC) werden uitgezaaid op een driedimensionale fibrinematrix vervaardigd uit 100% HMW fibrinogeen (foto A), 90% HMW + 10% LMW fibrinogeen (foto B), 80% HMW + 20% LMW fibrinogeen (foto C) of 60% HMW + 40% LMW fibrinogeen (foto D) en gestimuleerd met een combinatie van bFGF en $\text{TNF}\alpha$. De foto's zijn representatief voor 3 verschillende experimenten.

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

De onderhavige uitvinding verschaft een werkwijze voor het modificeren van de eigenschappen van een fibrinematrix met betrekking tot groei en ingroei van cellen, waarbij voor de vorming van de fibrinematrix een fibrinogeen wordt gebruikt dat bestaat uit een gekozen fibrinogeenvariant of een fibrinogeen dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is.

Ten aanzien van de te modificeren eigenschappen van de fibrinematrix met betrekking tot groei en ingroei van cellen kan aan diverse eigenschappen worden gedacht. Bij voorkeur gaat het hierbij om eigenschappen die de groei en ingroei van bloedvaten betreffen, zoals meer in het bijzonder angiogenese eigenschappen. Hierbij valt vooral te denken aan een modificatie die angiogenese versnelt dan wel een modificatie die angiogenese vertraagt.

Met "fibrinogeenvariant" wordt hier met name bedoeld op een in normale personen voorkomende variant van fibrinogeen. Met normale personen wordt bedoeld op gezonde personen die normaal fibrinogeen bezitten. In het bijzonder valt te denken aan een normale fibrinogeenvariant, gekozen uit de groep bestaande uit HMW fibrinogeen, LMW fibrinogeen, LMW' fibrinogeen, Fib420 fibrinogeen en gamma' fibrinogeen. Ook andere natuurlijke of artificiële varianten van fibrinogeen, zoals aan een polymorfisme te danken varianten, bijv. T/A312 fibrinogeen en R/K448 fibrinogeen, varianten met afwijkende fosforylering en/of glycosylering, en bijv. door middel van recombinant DNA technologie artificieel getrunceerde varianten, kunnen evenwel worden gebruikt om de eigenschappen van de fibrinematrix ten aanzien van celgroei en celingroei te modificeren. Een voorbeeld van artificieel getrunceerde varianten zijn LMW-achtige varianten, die net als LMW fibrinogeen een deel van een van de A α -ketens missen, maar

een groter of kleiner deel dan het natuurlijke LMW
fibrinogeen. Een ander voorbeeld zijn LMW'-achtige varianten,
waarvan beide A α -ketens, net als in LMW' fibrinogeen, voor
een deel ontbreken, maar waarbij de ontbrekende delen groter
5 of kleiner zijn dan in natuurlijk LMW' fibrinogeen.

De uitvinding betreft niet alleen het gebruik van een
gekozen fibrinogeenvariant die door isolatie uit natuurlijk
fibrinogeen is gewonnen, maar tevens het gebruik van een
gekozen fibrinogeenvariant die door middel van recombinant
10 DNA technologie is geproduceerd. De recombinante productie
van fibrinogeen is in de literatuur beschreven, bijv. in het
Amerikaanse octrooischrift US 6,037,457.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding wordt
voor de vorming van de fibrinematrix een fibrinogeen gebruikt
15 dat bestaat uit HMW fibrinogeen of uit een mengsel van
fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen of
verarmd is aan LMW fibrinogeen en/of LMW' fibrinogeen. In
deze uitvoeringsvorm leidt de gevormde fibrinematrix tot
versnelde angiogenese.

20 In een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding
wordt voor de vorming van de fibrinematrix een fibrinogeen
gebruikt dat bestaat uit LMW fibrinogeen of uit een mengsel
van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW fibrinogeen
of verarmd is aan HMW fibrinogeen. In deze uitvoeringsvorm
25 leidt de gevormde fibrinematrix tot vertraagde angiogenese.

In weer een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de
uitvinding wordt voor de vorming van de fibrinematrix een
fibrinogeen gebruikt dat bestaat uit LMW' fibrinogeen of uit
een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW'
30 fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen. Ook in deze
uitvoeringsvorm leidt de gevormde fibrinematrix tot
vertraagde angiogenese.

In weer een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding
wordt voor de vorming van de fibrinematrix een fibrinogeen

gebruikt dat bestaat uit Fib420 fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan Fib420 fibrinogeen.

5 In weer een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt voor de vorming van de fibrinematrix een fibrinogeen gebruikt dat bestaat uit gamma' fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan gamma' fibrinogeen.

10 Wanneer hier sprake is van een mengsel van fibrinogeenvarianten dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is, wordt daarmee bedoeld op een verrijking of verarming ten opzichte van het mengsel waaruit natuurlijk fibrinogeen bestaat. Met een mengsel dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen of verarmd is aan LMW fibrinogeen wordt derhalve
15 bedoeld op een mengsel dat significant meer dan 70% HMW fibrinogeen (bij voorkeur meer dan 80%, nog liever meer dan 90% HMW fibrinogeen) resp. significant minder dan 26% LMW fibrinogeen (bij voorkeur minder dan 20%, nog liever minder dan 10% LMW fibrinogeen) omvat. Met een mengsel dat verrijkt
20 is aan LMW fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen wordt omgekeerd bedoeld op een mengsel dat significant meer dan 26% LMW fibrinogeen (bij voorkeur meer dan 40%, nog liever meer dan 50% LMW fibrinogeen) resp. significant minder dan 70% HMW fibrinogeen (bij voorkeur minder dan 60%, nog
25 liever minder dan 50% HMW fibrinogeen) omvat. Met een mengsel dat verrijkt resp. verarmd is aan LMW' fibrinogeen wordt bedoeld op een mengsel dat significant meer resp. significant minder dan 4% LMW' fibrinogeen (bij voorkeur meer dan 10%, nog liever meer dan 20% LMW' fibrinogeen, resp. bij voorkeur
30 minder dan 2%, nog liever minder dan 1% LMW' fibrinogeen) omvat. Met een mengsel dat verrijkt resp. verarmd is aan Fib420 fibrinogeen wordt bedoeld op een mengsel dat significant meer resp. significant minder dan 5% Fib420 fibrinogeen (bij voorkeur meer dan 10%, nog liever meer dan

20% Fib420 fibrinogeen, resp. bij voorkeur minder dan 2%, nog liever minder dan 1% Fib420 fibrinogeen) omvat. Met een mengsel dat verrijkt resp. verarmd is aan gamma' fibrinogeen wordt bedoeld op een mengsel dat significant meer resp.

- 5 significant minder dan 8% gamma' fibrinogeen (bij voorkeur meer dan 15%, nog liever meer dan 20% gamma' fibrinogeen, resp. bij voorkeur minder dan 4%, nog liever minder dan 2% gamma' fibrinogeen) omvat.

Het begrip "fibrinematrix" zoals hierin gehanteerd heeft
 10 een ruime betekenis. Gewoonlijk zal de fibrinematrix, zoals van nature het geval is, behalve het fibrine, dat in de vorm van een netwerk van fibrinedraden de basis van de fibrine-matrix vormt, tevens andere stoffen bevatten. Het begrip
 "fibrinematrix" bedoelt echter niet alleen qua samenstelling
 15 min of meer natuurlijke fibrinematrices te omvatten, maar ook artificiële fibrinematrices die een van de natuurlijke samenstelling afwijkende verhouding van de componenten, zoals fibrine en collageen, vertonen.

De uitvinding betreft zowel *in vitro* als *in vivo*
 20 werkwijzen. Volgens een van de voorkeursuitvoeringsvormen wordt de fibrinematrix *in vitro* gevormd, waarbij de fibrine-matrix wordt gevormd door het fibrinogeen met behulp van een geschikt enzym, zoals trombine, en eventueel factor XIIIa en CaCl_2 , in fibrine om te zetten. De aldus verkregen fibrine-
 25 matrix kan dan bijv. dienst doen in een angiogenese test. Zo'n test kan gericht zijn op nieuwe wetenschappelijke inzichten, of gebruikt worden om stoffen te onderzoeken op hun eventuele werking of effect bij angiogenese. Meestal zal het gunstig zijn als de ingroei van cellen en bloedvaten snel
 30 optreedt, wat volgens de uitvinding kan worden bereikt door een fibrinogeenvariant te gebruiken die tot een fibrinematrix met versnelde angiogenese karakteristieken leidt, zoals het geval is bij gebruik van HMW fibrinogeen of een aan HMW fibrinogeen verrijkt mengsel van fibrinogeenvarianten.

Volgens een andere voorkeursuitvoeringsvorm heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze waarbij de fibrine-matrix *in vivo* wordt gevormd, waarbij het fibrinogeen, eventueel samen met een geschikt enzym, zoals trombine, en eventueel factor XIIIa en CaCl_2 , wordt aangebracht op de plaats waar de vorming van een fibrinematrix plaatsvindt (topicale toediening). Bijvoorbeeld wordt het fibrinogeen aangebracht om tumorgroei, littekenvorming, verklevingen en dergelijke te remmen of te verhinderen, of om de genezing van brandwonden en andere wonden te bevorderen.

Het effect op littekenvorming kan als volgt worden toegelicht. Fibrine vormt bij een vaatwandbeschadiging het netwerk dat een bloeding stopt. Het fibrinenetwerk fungeert vervolgens als matrix voor fibroblasten, endotheelcellen en endotheelvoorlopercellen die het littekenweefsel gaan vormen. De snelheid van ingroei van de cellen (= angiogenese) bepaalt mede de mate van littekenvorming. Het aanbrengen op de wond van een laagje fibrinogeen "sealant" van een bepaalde samenstelling, zal de snelheid van angiogenese beïnvloeden en daarmee de mate van littekenvorming. Bijvoorbeeld, zal een HMW-verrijkt sealant tot snellere vaatingroei en minder littekenweefsel leiden.

Wat verklevingen betreft, deze treden vaak op na chirurgische ingrepen. Tot 80-95% van de patiënten die een abdominale ingreep ondergaan, heeft in meer of mindere mate last van verklevingen. De verklevingen kunnen bestaan uit een dun filmpje van bindweefsel, of een dikke fibreuze laag met bloedvaten, of een direct contact tussen orgaanoppervlakken. Verklevingen kunnen verschillende complicaties geven, waaronder onvruchtbaarheid bij vrouwen of het afklemmen van de darmen. Verklevingen worden niet alleen veroorzaakt door chirurgische ingrepen, maar ook door bijv. infecties, ontstekingsziekten, endometriosis, etc. De eerste stap in het proces omvat de vorming van fibrine. Dit hoort tijdig weer

opgelost te worden door het fibrinolytisch systeem. Als het
fibrine niet tijdig oplost, kunnen zich fibrineuze
verklevingen ontwikkelen. De fibrine is namelijk een matrix
voor de ingroei van fibroblasten en dit leidt vervolgens tot
5 collageendepositie en vaatgroei en kan zo leiden tot perma-
nente verklevingen. Het inbrengen van een fibrinogeen waarin
de ingroei van vaten en de ingroei van fibroblasten vertraagd
is, zal het optreden van verklevingen helpen voorkomen. Ook
zou een laagje van een fibrinogeen dat verklevingen voorkomt,
10 bij chirurgische ingrepen direct op de betrokken organen
gebracht kunnen worden.

Behalve topicale toediening is echter ook een *in vivo*
toepassing mogelijk, waarbij het fibrinogeen systemisch wordt
toegediend, bijv. door middel van een intraveneuze injectie
15 of infusie, of op elke andere voor het beoogde doel geschikte
toedieningswijze.

Een andere mogelijkheid is dat de fibrinematrix *in vivo*
wordt gevormd, waarbij de gekozen fibrinogeenvariant *in situ*
wordt gevormd uit een andere fibrinogeenvariant. Een
20 voorbeeld van zo'n alternatieve aanpak is stimulatie van de
omzetting van HMW fibrinogeen in LMW fibrinogeen, bijv. in
het kader van een behandeling van post-trombotisch syndroom
(open been). Deze omzetting vindt van nature plaats onder
invloed van een enzym of combinatie van enzymen. Daarvan kan
25 gebruik worden gemaakt om haar extra te stimuleren, bijv.
door de expressie van het enzym te verhogen of door het enzym
zelf of een agonist daarvan toe te dienen.

De onderhavige uitvinding wordt eveneens belichaamd in
een farmaceutische samenstelling, welke fibrinogeen en een
30 farmaceutisch aanvaardbare drager omvat, waarbij het
fibrinogeen bestaat uit een gekozen fibrinogeenvariant of een
fibrinogeen dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt
of verarmd is.

De farmaceutische samenstelling kan eventueel ook andere componenten bevatten, zoals factor XIIIa en CaCl_2 , samen met of gescheiden van het fibrinogeen. Ook kan de farmaceutische samenstelling een geschikt enzym, zoals trombine, bevatten, 5 gescheiden van het fibrinogeen. Met "geschikt enzym" wordt bedoeld op een enzym dat in staat is fibrinogeen in fibrine om te zetten. Omdat deze omzetting normaliter pas mag plaatsvinden bij en na het aanbrengen op de plaats van bestemming, dient dit enzym pas dan, bij het aanbrengen, met 10 het fibrinogeen te worden verenigd.

In een bepaalde uitvoeringsvorm van de uitvinding gaat het hierbij om een farmaceutische samenstelling, waarbij het fibrinogeen bestaat uit HMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen 15 of verarmd is aan LMW en/of LMW' fibrinogeen. Zo'n farmaceutische samenstelling is geschikt voor het bevorderen van wondheling, het remmen of voorkomen van littekenvorming of het behandelen van brandwonden.

Volgens een andere voorkeursuitvoering van de uitvinding 20 gaat het hierbij om een farmaceutische samenstelling, waarbij het fibrinogeen bestaat uit LMW en/of LMW' fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW en/of LMW' fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen. Zo'n farmaceutische samenstelling is geschikt voor het remmen 25 of voorkomen van tumorgroei of verklevingen.

De onderhavige uitvinding betreft tevens een testkit, welke componenten voor de vorming van een fibrinematrix omvat, waaronder fibrinogeen, waarbij het fibrinogeen bestaat uit een gekozen fibrinogeenvariant of een fibrinogeen dat aan 30 een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is.

Bij voorkeur gaat het dan om een testkit, waarbij het fibrinogeen bestaat uit HMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen of verarmd is aan LMW fibrinogeen. Doorgaans zal de testkit

tevens een voor de vorming van fibrine uit fibrinogeen geschikt enzym, zoals trombine, alsmede eventueel factor XIIIa en/of CaCl_2 omvatten. Het enzym zal, indien aanwezig, normaliter in een gescheiden houder aanwezig zijn om

- 5 voortijdige omzetting van het fibrinogeen te voorkomen. Tevens zal de testkit componenten voor het tot stand brengen van angiogenese kunnen omvatten. De testkit zal als componenten voor het tot stand brengen van angiogenese een of meer angiogene groeifactoren, zoals fibroblast groeifactor-2
- 10 (FGF-2) of vasculair endotheel groeifactor (VEGF), en/of tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$), en/of cellen, zoals humane endotheelcellen, kunnen omvatten.

15 Samenvattend, kunnen de volgende toepassingen van de onderhavige uitvinding worden genoemd.

- tissue engineering: het moduleren van de karakteristieken van de fibrinebevattende matrix in relatie tot celgroei, bijvoorbeeld optimalisatie van de fibrinebevattende matrix voor een versnelde angiogenese (bv. fibrin sealants, wondheling, brandwonden), bijvoorbeeld door gebruik van

20 fibrinogeen dat verrijkt is in de HMW fibrinogeen vorm.

- tissue engineering: het moduleren van de karakteristieken van de fibrinebevattende matrix in relatie tot celgroei, bijvoorbeeld optimalisatie van de fibrinebevattende matrix voor een vertraagde angiogenese (bv. remming van groei van

25 tumoren, fibrin sealants), bijvoorbeeld door gebruik van fibrinogeen dat verrijkt is in de LMW fibrinogeen vorm.

- het versnellen van de *in vitro* angiogenese-testen, die nu bij gebruik van het totale fibrinogeen nog 7 dagen duren.

30 Versnelde ingroei van bloedvaatjes in de fibrinematrix, bijvoorbeeld door gebruik te maken van HMW-fibrinogeen, resulteert in een aanzienlijke versnelling van de *in vitro* testen, waardoor ze minder tijd vergen.

- het bevorderen of remmen van celgroei op een fibrine-bevattende matrix, bijv. om littekengroei, verklevingen e.d. te remmen en liefst te voorkomen.
- het *in vivo* moduleren van de verhouding HMW fibrinogeen / LMW fibrinogeen met als doel een fibrinematrix te laten ontstaan waarin celgroei gestimuleerd of geremd wordt. Dit zou bijvoorbeeld kunnen worden gedaan in het kader van een behandeling van post-trombotisch syndroom (open been). De beoogde modulatie van de verhouding HMW/LMW fibrinogeen zou kunnen worden gerealiseerd door de omzetting van HMW naar LMW te stimuleren dan wel te remmen, bijv. door een of meer van de enzymen die deze omzetting bewerkstelligen toe te voegen of een geschikte antagonist toe te voegen. Ook zou de endogene productie van een betrokken enzym gestimuleerd dan wel geremd worden.

Voorbeelden

Het in de hierna volgende voorbeelden gebruikte *in vitro* angiogenese model is gebaseerd op ingroei van humane voorhuid microvasculaire endotheelcellen (hMVEC) in een 3 dimensionale fibrinematrix (overigens kunnen ook voorhuid microvasculaire endotheelcellen van andere zoogdieren worden gebruikt). Na uitzaaïen van de hMVEC in een confluyente monolaag boven op de fibrinematrix kunnen deze hMVEC worden gestimuleerd tot het invaderen van de fibrinematrix waarin bloedvat-achtige structuren worden gevormd. Deze vaatvorming vindt plaats na stimulatie van de hMVEC met angiogene groeifactoren, zoals fibroblast groeifactor-2 (FGF-2) of vasculair endotheel groeifactor (VEGF), in combinatie met de ontstekingsmediator tumor necrosis factor α (TNF α).

Electronenmicroscopische analyse van de invasieve capillaire structuren maakt duidelijk dat de fibrinestructuur naast de ingegroeide cellen gedeeltelijk afgebroken is,

hetgeen aangeeft dat proteolytische processen betrokken zijn bij de celinvasie, vooral de celgebonden u-PA en plasmine activiteit. (Koolwijk et al., J. Cell Biol. 132: 1177-1188, 1996).

5 Deze experimenten zijn onder andere uitgevoerd met commercieel verkregen humaan fibrinogeen. Dit fibrinogeen bestaat uit een mengsel van de HMW, LMW en LMW' vormen. Bij gebruik van dit fibrinogeenmengsel begint de aanzet tot vaatvorming na ongeveer 3 dagen en kan hoeveelheid bloedvat-
10 achtige structuren na 7-10 dagen betrouwbaar gemeten worden m.b.v. een image analyse systeem (Koolwijk et al., J. Cell Biol. 132: 1177-1188, 1996).

Ook werden experimenten uitgevoerd met HMW-verrijkt en LMW-verrijkt fibrinogeen.

15

Kweek omstandigheden humane endotheelcellen

Humane voorhuid microvasculaire endotheelcellen (hMVEC) werden geïsoleerd en gekweekt in fibronectine-gecoate of gelatine-gecoate kweekplaten in medium M199 (Biowitthaker,
20 Verviers, België; beschreven in Morgan, Morton and Parker, Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 73: 1-8, 1950), 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES (pH 7.3) (Biowitthaker, Verviers, België), 10% hitte-geïnactiveerd humaan serum (serum gepooled van 15-20 donoren, verkregen van een locale bloedbank), 10% hitte-
25 geïnactiveerd pasgeboren kalfserum (Invitrogen, Paisley, Scotland), 150 µg/mL ruw endotheelcel groeifactorsupplement (ECGFs) (bereid van runder hersenen), 5 U/mL heparine (Leo Pharmaceutical Products, Weesp, Nederland), 100 IU/mL penicilline en 100 µg/mL streptomycine (Biowitthaker))..
30 Passage 10 cellen werden gebruikt voor de in vitro angiogenese experimenten.

Zuivering HMW en LMW fibrinogeen

Uit totaal fibrinogeen (gezuiverd uit plasma volgens de methode van Van Ruyven-Vermeer & Nieuwenhuizen, Biochem.J. 169: 653-658, 1978; of commercieel verkregen) worden de HMW, LMW en LMW' vorm van fibrinogeen gezuiverd.

Fibrinogeen wordt opgelost/gedialyseerd in een fysiologische buffer, zoals bijvoorbeeld Owren buffer of een Tris/HCl buffer (10mM Tris / HCl, pH 7.4). Hieraan wordt langzaam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd tot een eindconcentratie van 19%. De zo verkregen oplossing wordt 15-30 minuten gemengd bij kamertemperatuur en daarna 10 min gecentrifugeerd bij 2500 rpm. De pellet wordt opgenomen in het startvolume buffer (37°C onder voorzichtig zwenken) en nogmaals wordt de 19% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -precipitatiestap uitgevoerd. Na deze stap bevat het pellet zuiver HMW ($\pm 99\%$ zuiver), hetgeen weer in buffer wordt opgenomen.

Aan het supernatant van de eerste precipitatiestap wordt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd tot een eindconcentratie van 22%. Na mengen en centrifugeren wordt het supernatant verzameld. Hieraan wordt nu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd tot een eindconcentratie van 24%, na mengen en centrifugeren wordt de pellet opgenomen in buffer. Deze pellet bevat zuiver LMW fibrinogeen ($\pm 95\%$ zuiver).

Aan het supernatant wordt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd tot een eindconcentratie van 24%. Na mengen en centrifugeren wordt het supernatant verzameld. Hieraan wordt nu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd tot een eindconcentratie van 27%, na mengen en centrifugeren wordt de pellet opgenomen in buffer. Deze pellet bevat zuiver LMW' fibrinogeen ($\pm 95\%$ zuiver).

De oplossingen met HMW, LMW en LMW' fibrinogeen worden vervolgens gedialyseerd (tegen PBS of M199), gecontroleerd op zuiverheid door SDS-PAGE onder niet-reducerende condities, de concentratie wordt bepaald door meting van de extinctie bij

280 nm en de preparaten worden bij -80°C bewaard tot gebruik in de angiogenese-experimenten.

Zuivering van andere vormen van fibrinogeen

5 Fibrinogeen van vrijwilligers en/of patiënten met een bepaald genotype of een verhoogde/verlaagde concentratie van een variant fibrinogeen (zie Tabel) wordt gezuiverd volgens de methode van Van Ruyven-Vermeer & Nieuwenhuizen, Biochem.J. 169: 653-658, 1978. Het gezuiverde fibrinogeen wordt dan
10 gedialyseerd (tegen PBS of M199), gecontroleerd op zuiverheid door SDS-PAGE onder niet-reducerende condities, de concentratie wordt bepaald, bv. door meting van de extinctie bij 280 nm en de preparaten worden bij -80°C bewaard tot gebruik in de angiogenese-experimenten.

Bereiding van de fibrine gels

15 Driedimensionale humane fibrinematrices werden bereid door 2 µl van een 100 U/ml trombine oplossing toe te voegen aan 100 µl van een 2 mg/ml fibrinogeen oplossing in M199. Bij
20 sommige experimenten werd factor XIIIa met 5 mM CaCl₂ toegevoegd. Na 1 uur polymerisatie werd het trombine geïnactiveerd door de matrices 2-4 uur te incuberen met 0.2 mL M199 met 10% humaan serum en 10% pasgeboren kalfserum. Alle experimenten zijn minstens in duplo uitgevoerd.

In vitro angiogenese assay

25 De endotheelcellen werden losgemaakt van de met fibronectine gecoate of met gelatine gecoate kweekplaten met behulp van trypsine/EDTA en direct confluent uitgezaaid op de
30 fibrinematrices. Na 24 uur, en daarna steeds na 48 uur, werden de endotheelcellen gestimuleerd met M199, 10% humaan serum, 10% pasgeboren kalfserum, 10 ng/ml bFGF en 10 ng/ml TNFα. De vorming van vaatachtige structuren van endotheelcellen door invasie van de onderliggende matrices werd

geanalyseerd m.b.v. fasecontrastmicroscopie (Koolwijk et al., J. Cell Biol. 132: 1177-1188, 1996).

Figuur 1 toont het effect van variatie van fibrinogeen type op vaatingroei in de gevormde fibrinematrix. Op fibrine-
 5 matrices, gemaakt met ongefractioneerd fibrinogeen, groeien de hMVEC niet in onder controle (niet gestimuleerde) omstandigheden (foto's A en E). Indien gestimuleerd met een combinatie van bFGF en TNF α zijn er na ongeveer 3 dagen "aanzetjes" van vaatvorming te zien (zie pijlen in foto B),
 10 welke na 7 dagen uitgegroeid zijn tot vaat-achtige structuren die groot genoeg zijn om m.b.v. een videocamera, gemonteerd aan een omkeermicroscop en met behulp van een beeldanalyse programma te worden opgemeten (foto F). Dwarsdoorsneden van deze vaat-achtige structuren laten zien dat deze structuren
 15 een lumen bevatten omgeven met endotheelcellen (resultaten niet getoond). Indien de hMVEC op fibrinematrices gemaakt met gezuiverd HMW fibrinogeen gezaaid zijn, dan is te zien dat het ingroeien van de hMVEC veel sneller plaatsvindt. Na 3 dagen gestimuleerd met bFGF en TNF α zijn er al grote vaat-
 20 achtige structuren te detecteren die op dat moment uitstekend opgemeten kunnen worden m.b.v. de beeldanalyse apparatuur (foto C). Na 7 dagen zijn er al zoveel ingroeiende hMVEC zichtbaar dat dit niet meer goed te meten valt met de beeldanalyse apparatuur (foto G). Dit alles in tegenstelling
 25 met dat wat gevonden wordt indien de matrices gemaakt worden met gezuiverd LMW fibrinogeen. De hMVEC vormen dan geen vaat-achtige structuren meer na 3 en 7 dagen (foto's D en H), maar ook niet na 10 dagen stimuleren (data niet getoond).

Figuur 2 toont het effect van de hoeveelheid LMW
 30 fibrinogeen op vaatingroei in fibrinematrices gemaakt van HMW fibrinogeen. Op fibrinematrices die gemaakt zijn van 100% HMW fibrinogeen zijn er zeer vele ingroeiende, vaatvormende hMVEC te zien na een 7 daagse stimulatie periode (foto A). Naar mate meer LMW fibrinogeen is toegevoegd tijdens het stollen

van de matrices kunnen de hMVEC minder vaat-achtige structuren vormen. Bij een ratio van 60% HMW en 40% LMW zien we nagenoeg geen vaatingroei meer optreden (foto D).

5 Resultaten

Bij de beschreven experimenten vonden wij dat de heterogeniteit in natuurlijk voorkomend fibrinogeen de ingroei van bloedvaatjes in de fibrinematrix beïnvloedt (bij in vitro angiogenese). Zo blijken de hMVEC een versnelde ingroei in een fibrinematrix gevormd uit de HMW vorm van fibrinogeen te vertonen ten opzichte van het totale (ongefractioneerde, gemengde) fibrinogeen. Wanneer de vaatingroei in fibrine-matrices gevormd uit de LMW vorm van fibrinogeen bekeken werd, bleek deze in zijn geheel niet meer plaats te vinden. Zelfs na 10 dagen van stimulatie bleek er geen enkele vaat-achtige structuur te zijn ontstaan.

Wanneer de fibrinematrix werd gemaakt van een mengsel van HMW en LMW fibrinogeen, was duidelijk dat hoe groter het percentage LMW fibrinogeen, hoe minder snel de angiogenese plaatsvond. Bij een matrix gemaakt van 60% HMW / 40% LMW fibrinogeen was na 7 dagen nog nauwelijks een vaatachtige structuur zichtbaar.

Tabel. Natuurlijk voorkomende fibrinogeenvarianten

fibrinogeen variant	
genetische polymorfismen die leiden tot een ander eiwit	T/A312 polymorfisme in het fibrinogeen alfa gen en het R/K448 polymorfisme in het fibrinogeen bèta gen
variatie in fosforylering	Fibrinogeen circuleert met verschillende mate van fosforylering, vooral in pasgeborenen wordt een verhoogd fosforyleringsniveau gevonden
glycosylering / siaalzuur	Fibrinogeen circuleert met verschillende mate van glycosylering, vooral tijdens een acute fase reactie.
gamma'	Fibrinogeen waarbij in het COOH-terminale gamma-keten peptide de laatste vier aminozuren zijn vervangen door een 20-residue fragment dat rijk is aan asparagine- en glutaminezuur, met de sequentie Val-Arg-Pro-Glu-His-Pro-Ala-Glu-Thr-Glu-Tyr-Asp-Ser-Leu-Tyr-Pro-Glu-Asp-Asp-Leu
Fib420	Fibrinogeen met verlengde α -keten (αE) keten, moleculair gewicht ± 420 kDa, in gezonde personen $\pm 5\%$ van het totale circulerende fibrinogeen
HMW	Hoog moleculair gewicht fibrinogeen met beide $A\alpha$ -ketens intact, de vorm waarin fibrinogeen wordt gesynthetiseerd, in gezonde personen $\pm 70\%$ van het totale circulerende fibrinogeen
LMW	Laag moleculair gewicht fibrinogeen met een $A\alpha$ -keten intact en een gedeeltelijk afgebroken, in gezonde personen $\pm 26\%$ van het totale circulerende fibrinogeen
LMW'	Laag' moleculair gewicht fibrinogeen met beide $A\alpha$ -ketens gedeeltelijk afgebroken, in gezonde personen $\pm 4\%$ van het totale circulerende fibrinogeen

Conclusies

1. Werkwijze voor het modificeren van de eigenschappen van een fibrinematix met betrekking tot groei en ingroei van cellen, waarbij voor de vorming van de fibrinematix een fibrinogeen wordt gebruikt dat bestaat uit een gekozen
5 fibrinogeenvariant of een fibrinogeen dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij angiogenese eigenschappen van een fibrinematix worden gemodificeerd.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij de
10 fibrinogeenvariant wordt gekozen uit de groep bestaande uit HMW fibrinogeen, LMW fibrinogeen, LMW' fibrinogeen, Fib420 fibrinogeen en gamma' fibrinogeen.

4. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3, waarbij een fibrinematix wordt gevormd die tot versnelde
15 angiogenese leidt.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij voor de vorming van de fibrinematix een fibrinogeen wordt gebruikt dat bestaat uit HMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen of
20 verarmd is aan LMW fibrinogeen en/of LMW' fibrinogeen.

6. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3, waarbij een fibrinematix wordt gevormd die tot vertraagde angiogenese leidt.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij voor de
25 vorming van de fibrinematix een fibrinogeen wordt gebruikt dat bestaat uit LMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen.

8. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij voor de
30 vorming van de fibrinematix een fibrinogeen wordt gebruikt dat bestaat uit LMW' fibrinogeen of uit een mengsel van

fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW' fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen.

9. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-8, waarbij de fibrinematrix *in vitro* wordt gevormd, waarbij de fibrinematrix wordt gevormd door het fibrinogeen met behulp van een geschikt enzym, zoals trombine, en eventueel factor XIIIa en CaCl_2 , in fibrine om te zetten.

10. Werkwijze volgens conclusie 9, waarbij de fibrinematrix dienst doet in een angiogenese test.

11. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-8, waarbij de fibrinematrix *in vivo* wordt gevormd, waarbij het fibrinogeen, eventueel in combinatie met een geschikt enzym, zoals trombine, en eventueel factor XIIIa en CaCl_2 , wordt aangebracht op de plaats waar de vorming van een fibrinematrix plaatsvindt.

12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarbij het fibrinogeen wordt aangebracht om tumorgroei, littekenvorming, verklevingen en dergelijke te remmen of te verhinderen, of om de genezing van brandwonden en andere wonden te bevorderen.

13. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-8, waarbij de fibrinematrix *in vivo* wordt gevormd uit een fibrinogeen waarin de HMW/LMW en/of HMW/LMW' verhouding is gemoduleerd door de omzetting van HMW fibrinogeen in LMW fibrinogeen te stimuleren of te remmen, zoals in het kader van een behandeling van post-trombotisch syndroom.

14. Farmaceutische samenstelling, welke fibrinogeen en een farmaceutisch aanvaardbare drager omvat, waarbij het fibrinogeen bestaat uit een gekozen fibrinogeenvariant of een fibrinogeen dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is.

15. Farmaceutische samenstelling volgens conclusie 14, waarbij het fibrinogeen bestaat uit HMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen of verarmd is aan LMW en/of LMW' fibrinogeen.

16. Farmaceutische samenstelling volgens conclusie 15, welke geschikt is voor het bevorderen van wondheling, het remmen of voorkomen van littekenvorming of het behandelen van brandwonden.

5 17. Farmaceutische samenstelling volgens conclusie 14, waarbij het fibrinogeen bestaat uit LMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen.

10 18. Farmaceutische samenstelling volgens conclusie 14, waarbij het fibrinogeen bestaat uit LMW' fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan LMW' fibrinogeen of verarmd is aan HMW fibrinogeen.

15 19. Farmaceutische samenstelling volgens conclusie 17 of 18, welke geschikt is voor het remmen of voorkomen van tumorgroei of verklevingen.

20 20. Testkit, welke componenten voor de vorming van een fibrinematrix omvat, waaronder fibrinogeen, waarbij het fibrinogeen bestaat uit een gekozen fibrinogeenvariant of een fibrinogeen dat aan een gekozen fibrinogeenvariant verrijkt of verarmd is.

21. Testkit volgens conclusie 20, waarbij het fibrinogeen bestaat uit HMW fibrinogeen of uit een mengsel van fibrinogeenvarianten dat verrijkt is aan HMW fibrinogeen of verarmd is aan LMW en/of LMW' fibrinogeen.

25 22. Testkit volgens conclusie 20 of 21, welke tevens een voor de vorming van fibrine uit fibrinogeen geschikt enzym, zoals trombine, alsmede eventueel factor XIIIa en/of CaCl_2 omvat.

30 23. Testkit volgens een van de conclusies 20-22, welke tevens componenten voor het tot stand brengen van angiogenese omvat.

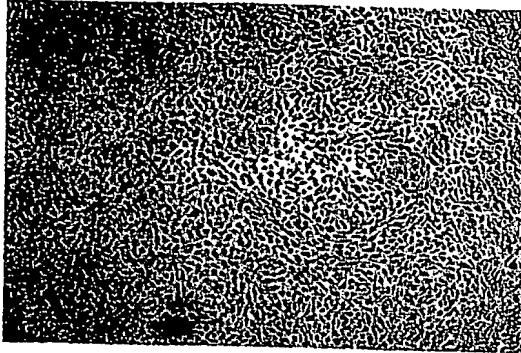
24. Testkit volgens conclusie 23, welke als componenten voor het tot stand brengen van angiogenese een of meer angiogene groeifactoren, zoals fibroblast groeifactor-2 (FGF-2) of

vasculair endotheel groeifactor (VEGF), en/of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), en/of cellen, zoals humane endotheelcellen, omvatten.

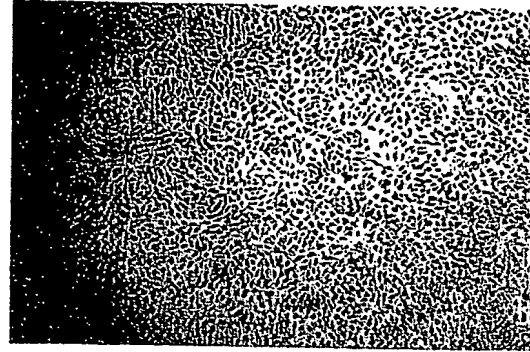
Dag 3

Dag 7

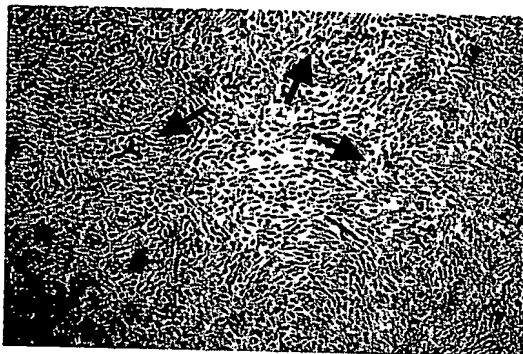
Ongefractioneerd, niet gestimuleerd



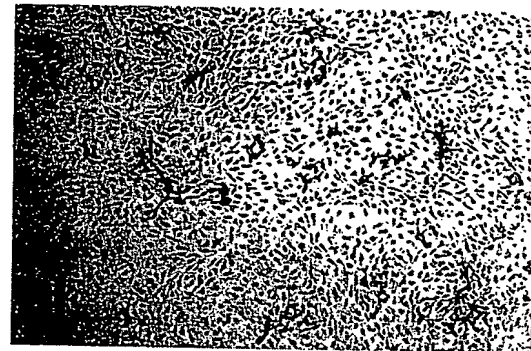
Ongefractioneerd, niet gestimuleerd



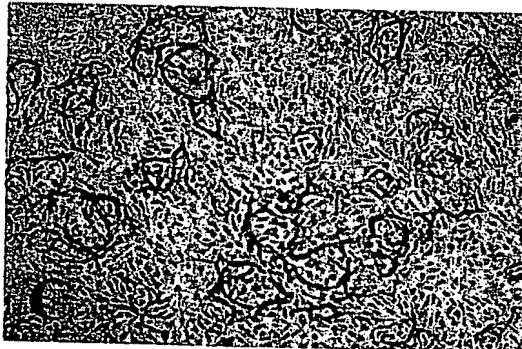
Ongefractioneerd, bFGF + TNF α



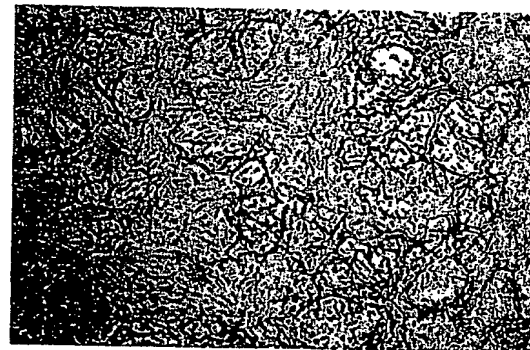
Ongefractioneerd, bFGF + TNF α



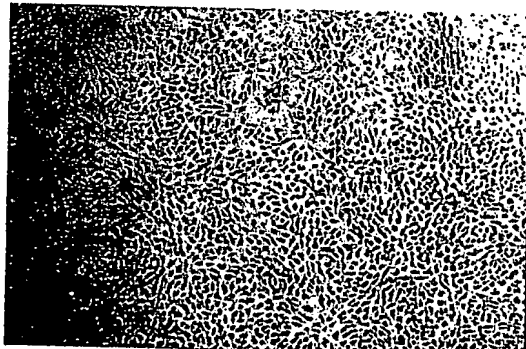
HMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α



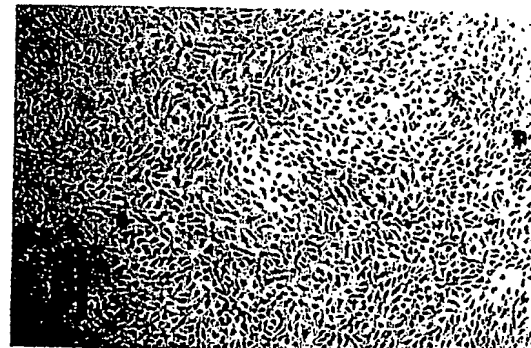
HMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α



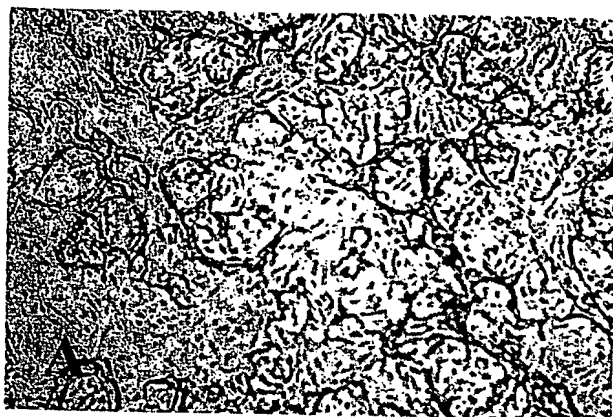
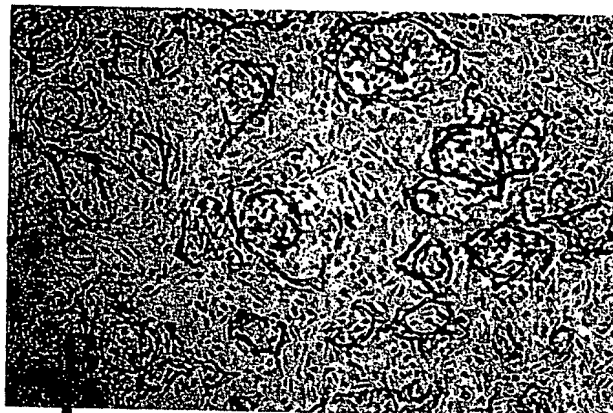
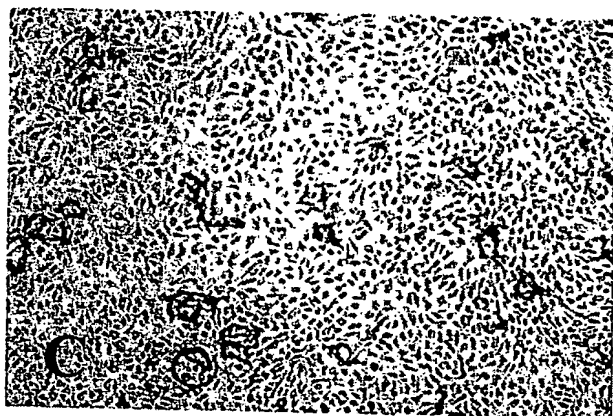
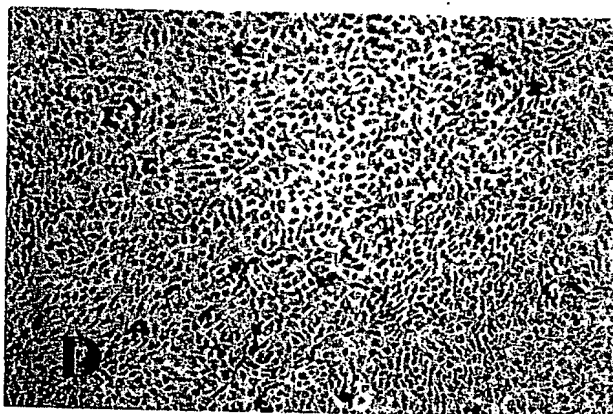
LMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α



LMW-fibrinogeen , bFGF + TNF α



Figuur 2.

100% HMW**90% HMW : 10% LMW****b****80% HMW : 20% LMW****60% HMW : 40% LMW**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.